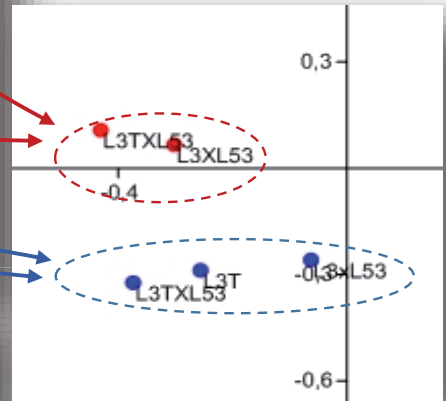
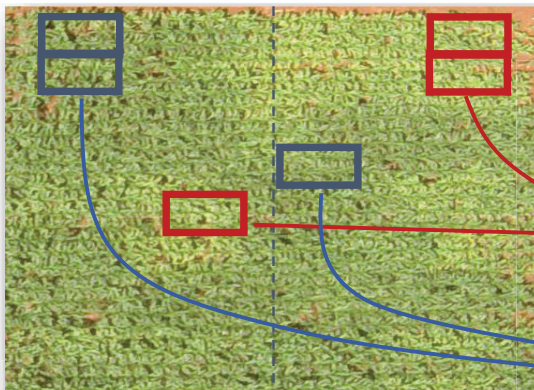


Diversidade e Atividade Metabólica de Microrganismos da Rizosfera de Genótipos de Milho Transgênicos Expressando o Gene *SbMATE* Cultivados sob Níveis Contrastantes de Alumínio



1,98	10,16	30,61	45,32
0,74	22,43	25,53	54,47
0,72	3,79	0,89	2,17
35,91	10,42	1,81	29,85
6,49	40,88	6,23	28,11
6,39	3,81	29,98	2,73
10,30	8,64	0,69	31,23
0,66	9,66	0,87	23,12

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 123

Diversidade e Atividade Metabólica de Microrganismos da Rizosfera de Genótipos de Milho Transgênicos Expressando o Gene *SbMATE* Cultivados sob Níveis Contrastantes de Alumínio

Eliane A. Gomes

Claudia T. Guimarães

Lucas F. da Silva

Ubiraci G. de Paula Lana

Ana Laura Verdolin

Christiane Abreu de O. Paiva

Fernando A. G. dos Santos

Embrapa Milho e Sorgo

Sete Lagoas, MG

2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso

Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de

Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Cláudia Teixeira Guimarães

1ª edição

Versão Eletrônica (2015)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Diversidade e atividade metabólica de microrganismos da

rizosfera de genótipos de milho transgênicos

expressando o gene SbMATE cultivados sob níveis

contrastantes de alumínio / Eliane Aparecida Gomes...

[et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2014.

30 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 123).

1. *Zea mays*. 2. Genética. 3. Tolerância ao alumínio. 4. Planta transgênica. 5. Microbiologia do solo. I. Gomes, Eliane Aparecida. II. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

© Embrapa 2015

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	11
Resultados	14
Discussão	21
Conclusão	24
Referências	24

Diversidade e Atividade Metabólica de Microrganismos da Rizosfera de Genótipos de Milho Transgênicos Expressando o Gene *SbMATE* Cultivados sob Níveis Contrastantes de Alumínio

Eliane A. Gomes¹

Claudia T. Guimarães²

Lucas F. da Silva³

Ubiraci G. de Paula Lana⁴

Ana Laura Verdolin⁵

Christiane Abreu de O. Paiva⁶

Fernando A. G. dos Santos⁷

Resumo

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho. No entanto, o país ainda enfrenta dificuldades para atingir maiores patamares de produtividade deste grão em função, principalmente, de estresses abióticos. A toxicidade do Al limita a produção das culturas, uma vez que reduz o crescimento radicular, afetando negativamente a capacidade da planta em obter água e nutrientes do solo. Importantes mecanismos de tolerância ao Al em plantas estão envolvidos na ativação de transportadores de membrana que mediam

¹Bióloga, D.Sc. em Genética, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, eliane.a.gomes@embrapa.br

²Eng.-Agrôn., D.Sc. em Melhoramento Genético Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, claudia.guimaraes@embrapa.br

³Estudante de mestrado Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Sete Lagoas – CSL, Caixa Postal: 56, Rodovia MG 424 – Km 47, CEP: 35701-970 – Sete Lagoas – MG lucasfernandes_silva@hotmail.com

⁴Químico, D.Sc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

⁵Engenheira Ambiental, BSc., Bolsista da Fapemig/Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, anne_agv@hotmail.com

⁶Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

⁷Biotecnologia, BSc., Estagiário da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, nando_biotec@ymail.com

*E.A. Gomes (autor correspondente): eliane.a.gomes@embrapa.br

a exsudação de ácidos orgânicos pelas células apicais das raízes formando um complexo quelante não tóxico com o Al no solo. Pesquisas objetivando o aumento da tolerância ao Al levaram à caracterização do gene *SbMATE* em sorgo, que codifica um transportador de citrato na raiz, ativado por Al, sendo o principal mecanismo de tolerância ao Al nessa espécie. A linhagem-elite de milho L3 da Embrapa foi transformada com o gene *SbMATE*, apresentando elevados níveis de expressão do transgene e de exsudação de citrato em solução nutritiva contendo níveis tóxicos de Al. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do milho transgênico superexpressando o gene *SbMATE* sobre a atividade e a diversidade metabólica de microrganismos da rizosfera em comparação com os genótipos convencionais. Estes parâmetros foram avaliados pelo consumo de diferentes fontes de carbono em Ecoplates™ Biolog, que fornece informações sobre a atividade metabólica dos microrganismos. A atividade e a diversidade microbiana variaram durante o desenvolvimento da cultura, apresentando o pico máximo durante o período de florescimento, sendo mais elevadas nos híbridos do que nas linhagens durante a fase de enchimento de grãos. Em todas as fases do desenvolvimento da cultura, a atividade metabólica do solo não rizosférico foi significativamente inferior em relação ao solo rizosférico, sendo essa diferença mais acentuada aos 90 dias, que coincide com a fase de enchimento de grãos. Os parâmetros utilizados para avaliar a atividade e a diversidade metabólica não mostraram diferença significativa entre as comunidades microbianas dos genótipos transgênicos e não transgênicos, indicando que o citrato exsudado pelas raízes de milho expressando o gene *SbMATE* não altera o metabolismo das comunidades microbianas do solo.

Palavras-chave: Biolog; Comunidade Microbiana; Rizosfera; *SbMATE*; Tolerância ao Al.

Diversity and Metabolic Activity of the Rhizosphere Microorganisms of Maize Transgenic Genotypes, Expressing the Gene SbMATE, Cultivated under Contrasting Aluminum Levels

Eliane A. Gomes¹

Claudia T. Guimarães²

Lucas F. da Silva³

Ubiraci G. de Paula Lana⁴

Ana Laura Verdolin⁵

Christiane Abreu de O. Paiva⁶

Fernando A. G. dos Santos⁷

Abstract

Brazil is the third largest producer of maize. However, the country still faces difficulties to achieve higher grain productivity levels due, mainly, to abiotic stresses. Al toxicity limits crop production, as it reduces root growth, negatively affecting the plant's ability to obtain water and nutrients from the soil. Important Al tolerance mechanisms in plants are involved in the activation of membrane transporters that mediate the exudation of organic acids by the root apical cells forming a non-toxic chelating complex with Al in the soil. Research aimed at improving tolerance to Al led to the characterization of SbMATE gene in sorghum, which encodes a root citrate efflux transporter that is Al-activated, being the main mechanism of Al tolerance in this species. The inbred line elite maize L3 from Embrapa was transformed with the gene SbMATE, showing high levels of transgene expression and exudation of citrate in nutrient solution containing toxic levels of Al. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of transgenic maize overexpressing the SbMATE

gene on the activity and the metabolic diversity of rhizosphere microorganisms as compared to the conventional genotypes. These parameters were evaluated by the consumption of different carbon sources on Biolog EcoplatesTM, which provides information about the metabolic activity of microorganisms. The activity and microbial diversity varied during the development of culture, with the peak during the flowering period, being higher in hybrids than in inbred lines during the grain filling stage. In all stages of development of the crop, the metabolic activity of the non-rhizosphere soil was significantly lower than in the rhizosphere, being this difference most pronounced at 90 days, coinciding with the grain filling stage. The parameters used to evaluate the activity and metabolic diversity showed no significant difference between the microbial communities of transgenic and non-transgenic genotypes, indicating that the citrate exuded by maize roots expressing SbMATE gene does not alter the metabolism of soil microbial communities.

Keyword: Biolog, Microbial community; Rhizosphere; SbMATE; Al tolerance.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado no mundo em razão da sua enorme aplicabilidade e importância econômica, o que é refletido nas suas amplas formas de utilização, indo desde a indústria de produção de alimentos para consumo humano e animal até a produção do etanol.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, sendo superado apenas pela China e pelos Estados Unidos (CONAB, 2015). A estimativa de área plantada, contemplando a primeira

e a segunda safra de 2014/2015 está em torno de 15 milhões de hectares, com uma produção de grãos entre 77,3 a 78,9 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Tais estimativas apresentam uma redução que poderá variar de 3,7 a 1,8% na área plantada e de 3,2 a 1,2% na produção de grãos, que podem ser explicadas principalmente pelas condições climáticas, que irão homologar ou não a produtividade estimada (CONAB, 2015).

Apesar de o Brasil participar ativamente no mercado internacional de exportação de milho, o país ainda enfrenta dificuldades para atingir patamares de produtividade mais altos por causa de problemas no sistema produtivo e de estresses bióticos e abióticos.

A toxicidade do alumínio destaca-se como uma importante limitação para a produção agrícola em solos ácidos, que representam mais de 50% das terras potencialmente aráveis do mundo (VON UEXKULL; MUTERT, 1995). A toxidez causada por níveis elevados de alumínio no solo inibe o desenvolvimento radicular, restringindo a capacidade da planta em obter água e nutrientes nas camadas mais profundas do solo (KOCHIAN et al., 2004). Alternativas de manejo são adotadas para amenizar o problema causado pela toxidez do Al, como a calagem, que consiste na precipitação do Al solúvel (Al^{3+}) pela adição de calcário agrícola. Porém, a eficiência da calagem limita-se a camadas superficiais do solo em razão da baixa mobilidade de componente solúveis do calcário (HARTWIG et al., 2007). No Brasil, com a expansão de novas fronteiras agrícolas para áreas do Pará e Tocantins, onde prevalece a alta acidez destes solos virgens, este tipo de limitação tem se tornado evidente.

Em associação com as práticas de correção e manejo da fertilidade do solo, uma estratégia sustentável para elevar a produtividade agrícola em solos ácidos seria a utilização de cultivares com patamares superiores de tolerância ao Al, seja por meio do melhoramento clássico ou da transgenia.

O principal mecanismo de tolerância ao Al em plantas envolve ativação de transportadores de membrana que são responsáveis pela exsudação de ácidos orgânicos no ápice radicular, sítio primário da toxidez do alumínio (RYAN et al., 2011). Uma vez na rizosfera, os ácidos orgânicos formam complexos estáveis e não tóxicos com o alumínio (DELHAIZE et al., 2007).

Um dos primeiros genes de tolerância ao Al em gramíneas, *SbMATE*, foi isolado utilizando clonagem posicional, baseada em mapa por Magalhães et al. (2007), em sorgo. Esse gene é responsável pelo principal loco de tolerância ao alumínio em sorgo, mapeado na região terminal do cromossomo 3, que explica aproximadamente 80% da tolerância ao alumínio nessa espécie (MAGALHÃES et al., 2004). O gene *SbMATE* é um membro da família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), que codifica um transportador de membrana, responsável pela exsudação de citrato ativada por Al^{3+} nos ápices radiculares de genótipos de sorgo tolerantes ao Al (MAGALHÃES et al., 2007).

Buscando aumentar a tolerância ao Al, a Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu uma linhagem transgênica de milho que, além de superexpressar o gene *SbMATE* de sorgo, apresenta níveis elevados de exsudação de citrato em solução nutritiva

quando comparadas às linhagens isogênicas não transgênicas (MITRE, 2014).

Modificações no padrão de expressão de proteínas heterólogas pelas plantas podem levar a alterações na comunidade microbiana presente na rizosfera das plantas. Isso ocorre porque a rizosfera, definida como a porção do solo influenciada pelas raízes, é um ambiente dinâmico onde a comunidade microbiana sofre efeito direto dos exsudatos radiculares. Estudos recentes não mostraram diferenças significativas entre a comunidade microbiana das plantas geneticamente modificadas em comparação com os controles não transgênicos (TAN et al., 2010, 2011). Ao contrário, outros estudos indicaram efeitos relacionados ao uso de plantas transgênicas, tais como a modificação do padrão de colonização de fungos micorrízicos, alterações nas comunidades de bactérias e fungos cultiváveis e uma mudança nas comunidades de fungos ativos do solo (MOTAVALLI et al., 2004; CASTALDINI et al., 2005; HANULLA et al., 2012). Dentro deste contexto, como aumento na exsudação de ácidos orgânicos pelas plantas de milho transgênicas pode levar a uma alteração na biodiversidade e na atividade da comunidade microbiana do solo, e por ser uma exigência dos órgãos regulamentares e da legislação de biossegurança, o desenvolvimento de pesquisas e metodologias para avaliar as comunidades microbiológicas no campo torna-se fundamental (VASCONCELOS; CARNEIRO, 2013). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos genótipos transgênicos superexpressando o gene *SbMATE* sobre a atividade e a diversidade metabólica de microrganismos da rizosfera.

Material e Métodos

Genótipos

Os genótipos utilizados foram L3T (linhagem L3 transgênica), L3 (linhagem L3 não transgênica), L3TxL53 (híbrido transgênico) e L3xL53 (híbrido não transgênico). A linhagem transgênica L3 (L3T) na geração RC2F4 foi gerada a partir de um evento transgênico no híbrido Hill (PÔSSA, 2010). Esse evento foi introgridido na linhagem elite L3 por meio de retrocruzamento assistido por marcadores, seguindo a metodologia descrita por Tinoco et al. (2010). Na geração RC2F2, a linhagem transgênica (L3T) foi selecionada em função da presença do transgene *SbMATE*, que foi autofecundada até a geração RC2F4 para obter o transgene em homozigose. Com o intuito de avaliar o transgene em combinações híbridas, as linhagens L3 transgênica e não transgênica foram cruzadas com a linhagem L53, obtendo-se híbridos isogênicos transgênicos e não transgênicos.

Área Experimental para Liberação Planejada de Plantas Transgênicas

O experimento foi realizado em local de liberação planejada na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, km 45, CEP 35701-970, Sete Lagoas, Minas Gerais, totalizando 896 m².

O plantio das linhagens e dos híbridos foi realizado em subáreas separadas por bordadura de genótipos não transgênicos. Cada parcela foi constituída por quatro linhas de 5 m com espaçamento de 0,7 m e 5 plantas/m, onde foram

plantados os pares de linhagens ou híbridos transgênicos e convencionais. Para o presente experimento, foram selecionados dois tratamentos, considerando alta (40 a 55%) e baixa saturação de Al (0 a 2%), com três repetições. A correção do solo foi realizada com a aplicação de 3,5 t ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT 95%). A adubação de plantio seguiu as recomendações da cultura com base na análise de fertilidade do solo (Figura 1).

LINHAGENS				HÍBRIDOS			
8,03	29,31	41,93	41,28	1,98	10,16	30,61	45,32
1,39	4,16	19,22	44,03	0,74	22,43	25,53	54,47
0,86	12,43	9,35	6,48	0,72	3,79	0,89	2,17
1,08	0,66	1,39	13,52	35,91	10,42	1,81	29,85
6,26	39,95	31,00	16,50	6,49	40,88	6,23	28,11
3,68	35,31	3,39	1,94	6,39	3,81	29,98	2,73
12,20	18,31	0,80	1,25	10,30	8,64	0,69	31,23
25,01	0,99	9,49	1,19	0,66	9,66	0,87	23,12

Figura 1. Esquema na área experimental, realçando as parcelas que foram amostradas nos tratamentos com alta (círculos vermelhos) e baixa (círculos azuis) saturação de Al no solo. O plantio das linhagens e dos híbridos foi separado por 2 m de bordadura de genótipos convencionais. Os valores dentro de cada quadrante referem-se aos níveis de saturação de Al no solo expressos em %.

Toda a área do experimento foi cercada e sinalizada com placas identificando o plantio de organismos geneticamente modificados (OGMs), a entrada era restrita para pessoal autorizado e treinado e o local foi monitorado constantemente por funcionários da empresa. A área de liberação permitiu um isolamento temporal, onde se manteve uma distância de 10 m de outros plantios de milho, respeitando o intervalo de

florescimento de 40 dias entre as datas de florescimento do evento de milho transgênico em relação às outras áreas com plantios não transgênicos.

As coletas de solo rizosférico foram realizadas aos 30 (fase vegetativa), 60 (florescimento) e 90 (enchimento de grãos) dias após o plantio, nas subparcelas circundadas em vermelho e azul na Figura 1. O sistema radicular de três plantas por linha foi coletado, sendo considerado como solo rizosférico aquele aderido às raízes. Após a coleta, as amostras foram transportadas em caixas térmicas contendo gelo e 5 g de raízes finas e centrais que continham solo aderido a elas foram colocadas em tubo cônico de 50 mL contendo solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v) e agitadas por 30 minutos em homogeneizador horizontal. Como controle, foi coletado na mesma área solo não rizosférico.

Determinação da Atividade e da Diversidade Metabólica de Microrganismos

Para a determinação da atividade e diversidade metabólica foram utilizadas placas Ecoplates™ (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA). Um volume de 5 mL da solução de pirofosfato de sódio 0,1% (m/v), contendo solo, foi centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante obtido foi diluído 50 vezes. Cada poço da placa de Biolog foi inoculado com 120 µL da solução e as placas foram incubadas no escuro durante 5 dias a 28 °C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Labstems, MultSkan, MS, EUA) com comprimento de onda de 590 nm, nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. A leitura de 72 horas foi utilizada para cálculos dos componentes de diversidade metabólica por representar o pico máximo de

atividade microbiana entre as leituras realizadas. Esses dados foram utilizados para estimativa dos valores da atividade total e do índice de diversidade de Shannon (H) de acordo com Zak et al. (1994).

Os valores da atividade total foram transformados utilizando-se a média das leituras dos 31 substratos de cada amostra e de cada repetição. O índice de atividade metabólica AWCD foi obtido por meio da divisão da atividade de utilização dos substratos em leitura por absorbância da cor desenvolvida em cada cavidade pelo valor médio da leitura da placa inteira (GARLAND; MILLS, 1991). Os valores acima de zero foram considerados como reação positiva, evidenciando a utilização de substratos, enquanto os valores negativos evidenciaram a ausência de uso do substrato. Os resultados em AWCD e índice de Shannon foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade e teste de Scott Knott, a 1% e 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

Resultados

Atividade Metabólica de com Unidades Microbianas

Para compreender a dinâmica das comunidades microbianas da rizosfera em três fases ao longo do desenvolvimento da cultura do milho (30, 60 e 90 dias após o plantio), foi avaliado o padrão de consumo de 31 fontes de carbono presentes nas Ecoplates™ Biolog por meio de desenvolvimento de cor expresso pelo índice AWCD ao longo do período de 96 horas, com leituras a cada 24 horas.

O índice AWCD variou ao longo do tempo de incubação, atingindo o pico máximo após 72 horas, para a maioria dos genótipos avaliados (Figura 2). Assim, foi determinado que o período de 72 horas de incubação seria o tempo ideal para as análises posteriores, tanto em termos da atividade metabólica quantificada por AWCD quanto para a diversidade metabólica utilizando o índice de Shannon das comunidades microbianas da rizosfera. As médias da atividade metabólica (AWCD) das comunidades microbianas presentes na rizosfera dos diferentes genótipos aos 30, 60 e 90 dias após o plantio foram comparadas utilizando o teste de Scott-Knott. Aos 30 e 60 dias do desenvolvimento da cultura, as comunidades microbianas dos genótipos não apresentaram diferenças na atividade metabólica, diferindo apenas em relação ao solo não rizosférico (Tabela 1). No entanto, aos 90 dias, na fase de enchimento de grãos, a comunidade microbiana dos híbridos apresentou uma maior atividade metabólica em relação às linhagens, independentemente de os genótipos serem transgênicos ou não. Nota-se que a atividade metabólica do solo não rizosférico foi significativamente inferior em relação ao solo rizosférico em todas as fases do desenvolvimento da cultura (Tabela 1), como esperado.

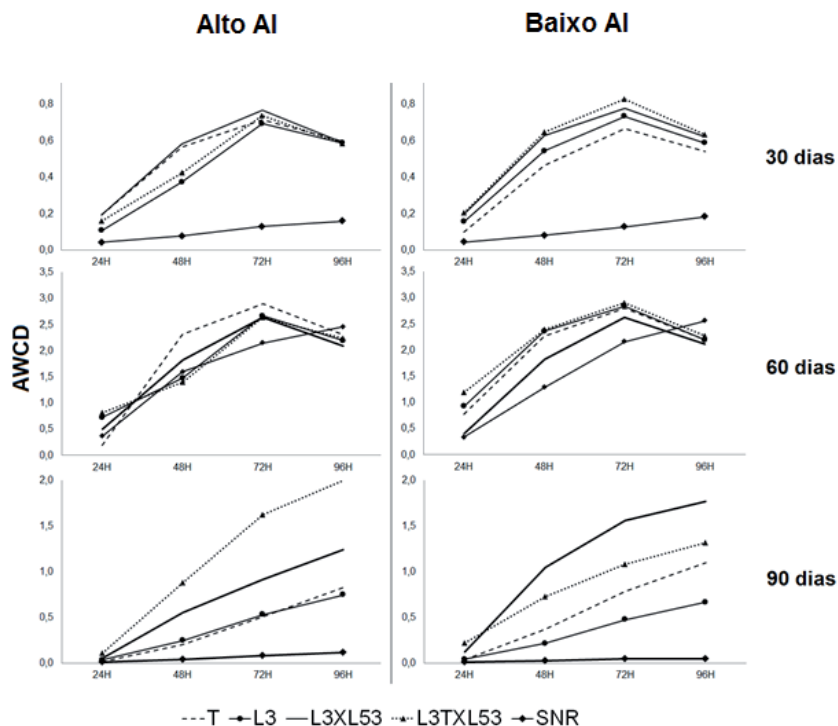


Figura 2. Medida de desenvolvimento de cor (AWCD) com base no padrão de utilização dos substratos em placas Biolog Ecoplate™ das comunidades microbianas da rizosfera de milho. Os dados foram registrados para leituras a 590 nm após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação a 28 °C. (L3T) linhagem L3 transgênica; (L3) linhagem L3 não transgênica; (L3xL53) híbrido não transgênico; (L3TxL53) híbrido transgênico e (SNR) solo não rizosférico. Amostras coletadas em alto e baixo alumínio ao longo de 30, 60 e 90 dias do desenvolvimento da cultura.

Tabela 1. Comparação das médias da atividade metabólica (AWCD) de comunidades microbianas da rizosfera de genótipos de milho transgênico e não transgênico pelo teste de Scott-Knott ao longo do desenvolvimento da cultura.

Genótipos	30 dias	60 dias	90 dias
L3TxL53*	0,781 a**	2,775 a	1,353 a
L3xL53	0,771 a	2,632 a	1,240 a
L3	0,771 a	2,754 a	0,507 b
L3T	0,690 a	2,846 a	0,651 b
SNR	0,128 b	2,157 b	0,067 c

*Genótipos seguidos da letra T são eventos transgênicos e SNR: solo não rizosférico.

**Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

A análise de regressão possibilitou a visualização do comportamento das comunidades microbianas ao longo do desenvolvimento da cultura (Figura 3). O pico máximo de atividade metabólica das comunidades microbianas foi aos 60 dias, coincidindo com a fase de florescimento, sendo que as amostras de solo não rizosférico apresentaram atividade inferior ao longo de todo o desenvolvimento da cultura. Adicionalmente, a superioridade dos híbridos quanto à atividade metabólica em relação às linhagens foi observada apenas aos 90 dias após o plantio.

A análise de componentes principais com base nos valores de AWCD das amostras coletadas aos 60 dias, quando ocorreu o pico de atividade máxima das comunidades microbianas, revelou que a soma do primeiro e do segundo componente

principal foi responsável por 70,19% do total da variação observada (Figura 4). Foi observada uma tendência para o agrupamento dos genótipos de milho cultivados sob baixa saturação de Al, sendo concentrado no quadrante inferior esquerdo, representado pelos autovetores negativos do CP1 e do CP2. Os genótipos cultivados sob alta saturação de Al foram um pouco mais dispersos, mas sem uma tendência clara de agrupamento entre híbridos e linhagens, ou entre transgênicos e não transgênicos (Figura 4). Assim, a diversidade metabólica da comunidade microbiana da rizosfera parece ter sido mais influenciada pelas condições de saturação de Al no solo do que pelos genótipos de milho. Um perfil semelhante foi obtido por meio da análise de componentes principais utilizando as amostras coletadas aos 30 e 90 dias após o plantio (dados não mostrados).

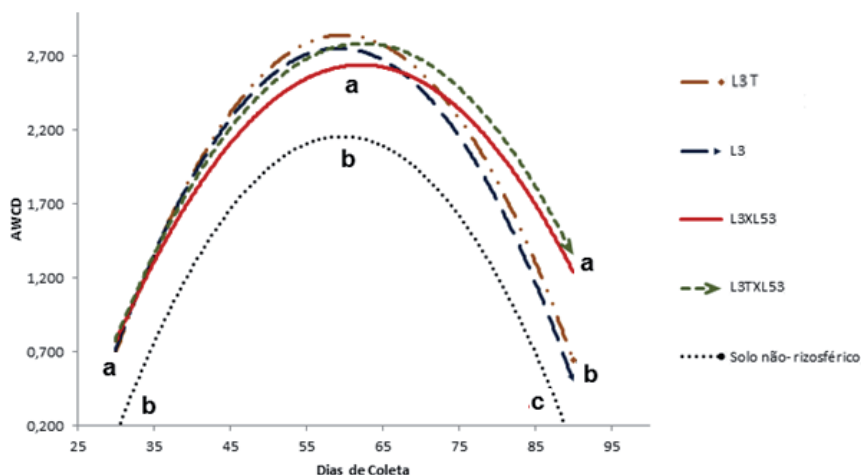


Figura 3. Análise de regressão baseada nos valores de atividade metabólica (AWCD), ao longo das três fases de desenvolvimento da cultura (30, 60 e 90 dias). Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade. Genótipos seguidos da letra T são eventos transgênicos.

Diversidade Metabólica Avaliada pelo Índice de Shannon

Os valores de AWCD obtidos pelo consumo de diferentes fontes de carbono em placas de Biolog foram convertidos em índice de diversidade de Shannon (H). O teste de média foi semelhante ao obtido com os valores de AWCD, exceto aos 60 dias, cuja diversidade metabólica das amostras de solo rizosférico e não rizosférico não apresentou diferença pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Aos 30 dias de desenvolvimento da cultura, as comunidades microbianas da rizosfera diferiram significativamente da amostra de solo não rizosférico. Aos 90 dias, as comunidades de solo rizosférico dos híbridos foram superiores às linhagens, independentemente de serem ou não transgênicos (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação das médias da diversidade metabólica (Índice de Shannon) de comunidades microbianas da rizosfera de genótipos de milho transgênico e não-transgênico pelo teste de Scott-Knott ao longo do desenvolvimento da cultura.

Genótipos	30 dias	60 dias	90 dias
L3TXL53*	3,354 a**	3,396 a	2,917 a
L3XL53	3,371 a	3,390 a	2,948 a
L3	3,330 a	3,398 a	2,485 b
L3T	3,326 a	3,407 a	2,610 b
SNR	2,869 b	3,269 a	1,507 c

*Genótipos seguidos da letra T são eventos transgênicos e SNR: solo não rizosférico.

**Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

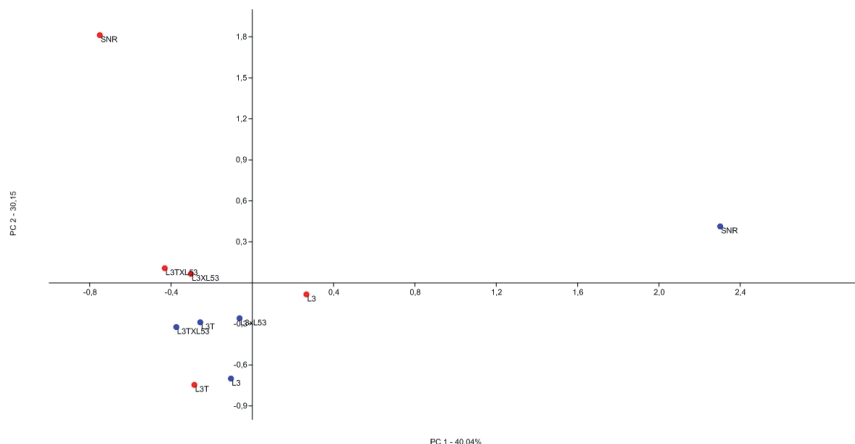


Figura 4. Análise de componentes principais (PCA) da estrutura de comunidade bacteriana com base nos valores de atividade metabólica (AWCD) obtidos pelo consumo de fontes de carbono em placas de Biolog Ecoplate™ aos 60 dias após o plantio, após 72 horas de incubação. As amostras de solo rizosférico foram coletadas de linhagem L3 transgênica (L3T), linhagem L3 não transgênica (L3), híbridos não transgênicos (L3xL53), híbridos transgênicos (L3TxL53) e de solo não rizosférico (SNR). Pontos vermelho representam os genótipos cultivados sob alta saturação de Al e pontos azuis, os genótipos cultivados sob baixa saturação de Al.

A análise de regressão com base no Índice de Shannon revelou um perfil da diversidade das comunidades microbianas da rizosfera ao longo dos três meses do desenvolvimento da cultura de milho semelhante ao obtido com os valores de AWCD. Aos 30 dias, foi observada uma diferença entre as comunidades microbianas presente no solo não rizosférico em comparação com o solo rizosférico. O pico máximo de diversidade foi aos 60 dias, sem diferença significativa entre as amostras. Aos 90 dias, houve uma diferenciação

entre genótipos, em que os híbridos (L3TxL53 e L3xL53) apresentaram maiores índice de diversidade, seguidos das linhagens (L3T e L3) e do solo não rizosférico (SNR) (Figura 5).

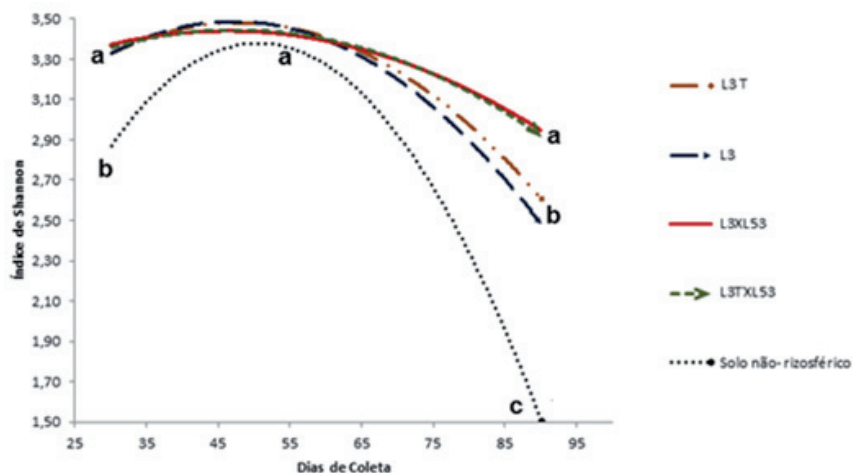


Figura 5. Análise de regressão baseada nos valores do Índice de Shannon ao longo das três fases de desenvolvimento da cultura (30, 60 e 90 dias). Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade. Genótipos seguidos da letra T são eventos transgênicos e SNR: solo não rizosférico.

Discussão

As análises da atividade e diversidade metabólica das comunidades microbianas da rizosfera, fundamentais para o monitoramento da qualidade biológica do solo, foram avaliadas pelo consumo de diferentes fontes de carbono em Ecoplates™ Biolog. O pico máximo de atividade da comunidade microbiana observada após 72 horas de incubação das placas também foi observado em outros trabalhos como o melhor tempo de

leitura para representar os dados de Biolog (LEWIS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

A intensidade e a diversidade da atividade metabólica das comunidades microbianas foram superiores em solo rizosférico em comparação com o solo não rizosférico para valores de AWCD e para o Índice de Shannon. Além disso, a análise de componentes principais confirmou as diferenças significativas quanto à atividade metabólica nas amostras de solo não rizosférico em relação às demais amostras coletadas na rizosfera dos diferentes genótipos. Segundo Marschner (1998), a taxa de liberação de carbono orgânico pelas raízes pode favorecer o aumento da densidade populacional das comunidades microbianas da rizosfera, especialmente de bactérias, em relação ao restante do solo.

O pico máximo de atividade metabólica e diversidade das comunidades microbianas nos genótipos de milho estudados foi aos 60 dias, coincidindo com a fase de florescimento da cultura. Vários trabalhos têm relatado que a fase de florescimento é a fase relativa à maior atividade microbiana, por causa da maior taxa de exsudação e liberação de fontes de carbono pela planta. A principal fonte de C para os microrganismos do solo são os exsudatos das raízes, que, no período de florescimento e frutificação das plantas, estão em pleno desenvolvimento e atividade, e quando estes estágios vegetais ocorrem simultaneamente com temperatura e umidade favoráveis promovem o crescimento e atividade da biomassa (LYNCH; PANTING, 1982; PEIFFER; LEY, 2013).

Além disso, mudanças nas comunidades microbianas da rizosfera entre híbridos e linhagens foram detectadas na

fase de enchimento de grãos (90 dias após o plantio) com superioridade para os híbridos. Em estudos da atividade metabólica da rizosfera de genótipos de milho contrastantes quanto à eficiência na aquisição de fósforo, Oliveira et al. (2009) apresentaram resultados semelhantes, em que, em condições com estresse mineral de P no solo, os híbridos apresentaram maior atividade metabólica que as demais linhagens.

Picard et al. (2008) também mostraram que híbridos de milho, em comparação com as linhagens, têm a capacidade de afetar positivamente a população microbiana do solo, estimulando o crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, bem como fungos micorrízicos arbusculares. Com base nessas informações e nos resultados obtidos no presente trabalho, é possível levantar a hipótese de que a diferença estatística encontrada na atividade metabólica entre híbridos e linhagens no período de enchimento de grãos (90 dias) tenha relação com aumento das comunidades microbianas benéficas encontradas em solo rizosférico dos híbridos.

A análise de componentes principais com base nos valores de AWCD para cada um dos substratos presentes na placa de Biolog possibilitou identificar uma tendência no agrupamento das comunidades microbianas rizosféricas em função do cultivo sob diferentes níveis de saturação de Al. Outros autores mostraram que comunidades microbianas da rizosfera de sorgo também são alteradas em função dos níveis de saturação de Al no solo, acarretando possíveis mudanças nas densidades populacionais de grupos específicos metabolicamente ativos (MOTA et al., 2009; GOMES et al. 2014).

Conclusão

Com base nos resultados descritos na literatura e nos resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que os níveis contrastantes de concentração de Al no solo, a fase desenvolvimento da cultura e a presença de híbridos e de linhagens influenciaram a estrutura e a composição das comunidades microbianas do solo. Além disso, as comunidades microbianas coletadas em solo rizosférico apresentaram maior atividade e diversidade metabólica que as comunidades microbianas do solo não rizosférico. No entanto, a atividade e a diversidade metabólica das comunidades microbianas da rizosfera de linhagens e híbridos de milho não foram afetadas em função da expressão do transgene *SbMATE*.

Agradecimentos: À Embrapa, à Fapemig e ao Generation Challenge Program pelo suporte financeiro

Referências

CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDITTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; FABIANI, A.; LANDI, S.; SANTOMASSIMO, F.; PIETRANGELI, B.; NUTI, M. P.; MICLAUS, N.; GIOVANNETTI, M. Impact of *Bt* corn in rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento.

Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2014/2015: nono levantamento: monitoramento agrícola: cultivos de verão,

2ª safra e de inverno: safra 2014/15: junho/2015. Brasília, 2015. 104 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_11_09_00_38_boletim_graos_junho_2015.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2014.

DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P. R. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 2255-2262, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GOMES, E. A.; OLIVEIRA, C. A. de; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. de P.; SILVA, L. F.; MARRIEL, I. E. **Análise da diversidade de comunidades microbianas na rizosfera de genótipos de sorgo contrastantes quanto à tolerância ao alumínio**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 29 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 94).

HANULLA, S. E.; BOSCHKER, H. T. S.; DE BOER, W.; VAN VEEN, J. A. ¹³C pulse-labeling assessment of the community structure of active fungi in the rhizosphere of a genetically starch modified potato (*Solanum tuberosum*) cultivar and its parental isoline. **New Phytologist**, Cambridge, v. 194, p. 784-799, 2012.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. N. R.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, p. 219-228, 2007.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, A. O.; PIÑEROS, M. A. How do plants tolerate acid soils? Mechanism of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

LEWIS, D. E.; WHITE, J. R.; WAFUL, D.; ATHAR, R.; DICKERSON, T.; WILLIAMS, H. N. Soil functional diversity analysis of a bauxite-mined restoration chronosequence. **Microbial Ecology**, New York, v. 59, p. 710-723, 2009.

LYNCH, J. M.; PANTING, L. M. Effects of season, cultivation and nitrogen fertiliser on the size of the soil microbial biomass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 33, p. 249-252, 1982.

MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Austin, v. 167, p. 1905-1914, 2004.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, A. O.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers

aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MARSCHNER, H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 56, p. 203-207, 1998.

MITRE, L. K. **Caracterização genética e morfofisiológica de linhagens e híbridos transgênicos de milho expressando o gene SbMATE de sorgo**. 2014. 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MOTA, F. F. da; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Bacterial and fungal communities in bulk soil and rhizospheres of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive maize (*Zea mays* L.) lines cultivated in unlimed and limed Cerrado soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 805-814, 2008.

MOTAVALLI, P. P.; KREMER, R. J.; FANG, M.; MEANS, N. E. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbial mediated plant nutrient transformations. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 816-824, 2004.

OLIVEIRA, C. A. de; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; SCOTTI, M. R.; ALVES, V. M. C. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 11, p. 1473-1482, nov. 2009.

PEIFFER, J. A.; LEY, R. E. Exploring the maize rhizosphere microbiome in the field: a glimpse into a highly complex system. **Communicative and Integrative Biology**, v. 6, n. 5, p. e25177, 2013.

PICARD, C.; BARUFFA, E.; BOSCO, M. Enrichment and diversity of plant-probiotic microorganisms in the rhizosphere of hybrid maize during four growth cycles. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 40, p. 106-115, 2008.

PÔSSA, K. F. **Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene SbMATE, que confere tolerância ao alumínio em sorgo**. 2010. 108 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W. H.; DELHAIZE, E. The identification of aluminum-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 9-20, 2011.

TAN, F.; WANG, J.; FENG, Y.; CHI, G.; KONG, H.; QIU, H.; WEI, S. Bt corn plants and their straw have no apparent impact on soil microbial communities. **Plant and Soil**, The Hague, v. 329, p. 349-364, 2010.

TAN, F.; WANG, J.; CHEN, Z.; FENG, Y.; CHI, G.; REHMAN, S. U. Assessment of the arbuscular mycorrhizal fungal community in roots and rhizosphere soils of Bt corn and their non-Bt isolines. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 43, p. 2473-2479, 2011.

TINOCO, C. F. da S.; MAGALHAES, J. V.; BELICUAS, S. N. J.; GUIMARAES, L. J. M.; PARENTONI, S. N.; LANA, U. G. de P.; GUIMARAES, C. T. **Obtenção de linhagens isôgenicas para QTLs de tolerância ao alumínio em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores moleculares**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 145).

VASCONCELOS, M. J. V. de; CARNEIRO, A. A. **Metodologia de análise de biossegurança**: análise de risco de milho geneticamente modificado. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 201).

VON UEXKULL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. In: DATE, R. A.; GRUNDON, N. J.; RAYMET, G. E.; PROBERT, M. E. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH**: principles and management. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 5-19.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MORRHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

